

# 枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的拮抗作用及生防潜力

胡丽杰, 闫思远, 李嘉泓, 杜娟, 顾沛雯\*

(宁夏大学农学院, 银川 750021)

**摘要** 为了明确枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌的抑制作用,通过室内抑菌试验和离体试验测定了内生真菌对胶孢炭疽菌的抑制作用及对枸杞炭疽病的防治效果。结果表明,镰刀菌属 *Fusarium* 菌株 NQ8GII4、NQ8GII7、NQ7GII4 和篮状菌属 *Talaromyces* 菌株 NQ6GIII1 对胶孢炭疽菌有明显的拮抗作用。平板对峙试验显示,上述4株枸杞内生真菌具有较强的营养和空间竞争能力,菌株 NQ8GII4 对病原菌的抑制率高达 93.43%。显微观察发现,枸杞内生真菌能缠绕并穿透胶孢炭疽菌菌丝,使胶孢炭疽菌菌丝膨胀崩解。菌株 NQ7GII4 的培养滤液在浓度为 15% 时对病原菌菌丝的抑制率达到 70.75%,菌株 NQ8GII7 产生的挥发性物质对胶孢炭疽菌抑制率高达 83.44%。离体生防试验结果表明,用拮抗性内生真菌预先占位接种枸杞嫩果及叶片,能有效抑制枸杞炭疽病菌的侵入和病斑的扩展,菌株 NQ8GII4 10% 培养滤液对枸杞炭疽病的防治效果最强,防效达到了 92.54% 和 95.57%,说明枸杞内生真菌具有很好的生防潜力和应用前景。

**关键词** 枸杞内生真菌; 胶孢炭疽菌; 拮抗作用; 生物防治

**中图分类号:** S 435.671 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018532

## Antagonism and control potential of endophytic fungi from *Lycium barbarum* against *Colletotrichum gloeosporioides*

HU Lijie, YAN Siyuan, LI Jiahong, DU Juan, GU Peiwen\*

(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract** In order to explore the inhibitory effect of the endophytic fungi from *Lycium barbarum* against *Colletotrichum gloeosporioides*, their inhibitory effects and biocontrol potential against the anthracnose were determined by using indoor bacteriostatic test and *in vitro* test. The results showed that *Fusarium* strains NQ8GII4, NQ8GII7, NQ7GII4 and *Talaromyces* strain NQ6GIII1 had obvious antagonistic effects on *C. gloeosporioides*. The plate confrontation test showed that the above four endophytic fungi had strong nutrition and space competitiveness, and the inhibition rate of strain NQ8GII4 against the pathogenic bacteria reached 93.43%. According to microscopic observation, endophytic fungi from *L. barbarum* could entangle and penetrate the hyphae of *C. gloeosporioides*, leading to disintegration of the hyphae of *C. gloeosporioides*. When the concentration of NQ7GII4 culture filtrate was 15%, the inhibition rate of mycelium was 70.75%, while the inhibition rate of volatile substances produced by strain NQ8GII7 against *C. gloeosporioides* was as high as 83.44%. The results of *in vitro* biocontrol experiments showed that vaccination of antagonistic endophytic fungi in tender fruits and leaves of *L. barbarum* could effectively inhibit the invasion of *L. barbarum* anthracnose and the expansion of lesions. The culture filtrate of strain NQ8GII4 10% had the strongest control effect on *L. barbarum* anthracnose, and the control effect reached to 92.54% and 95.57%, indicating that *L. barbarum* endophytic fungi had good biocontrol potential and application prospects.

**Key words** *Lycium barbarum* endophytic fungi; *Colletotrichum gloeosporioides*; antagonism; biological control

收稿日期: 2018-12-26 修订日期: 2019-02-15

基金项目: 国家自然科学基金(31460484)

\* 通信作者 E-mail: gupeiwen2013@126.com

枸杞 *Lycium barbarum* 是一种重要的中药材,枸杞炭疽病由胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起。一般年份引起产量损失平均在 30% 以上,流行年份达 70% 以上<sup>[1]</sup>,已成为制约枸杞产业发展的重要因素之一。目前,生产上多采用化学农药防治枸杞炭疽病,但由于化学农药的不规范使用,造成枸杞农药残留问题突出,使枸杞出口面临严峻挑战<sup>[2]</sup>,枸杞产业遭受重创,因此寻找安全无污染的生物防治方法迫在眉睫。

植物内生真菌是指其生活史的某一阶段或整个阶段生活在健康的植物组织或细胞内,且不会引起宿主植物产生明显病害症状的一类真菌<sup>[3]</sup>。植物内生真菌作为潜在的生防因子,主要通过与病原菌争夺营养物质和空间来抑制病原菌的生长,或通过产生抗生素类和水解酶类等物质抑制病原菌的正常生长,最终导致其死亡<sup>[4]</sup>。植物内生真菌还可促进寄主植物生长<sup>[5]</sup>,增强其抗病能力<sup>[6-8]</sup>。目前,对枸杞内生真菌的报道较少,徐全智等<sup>[9]</sup>从枸杞内分离了 363 株内生真菌,其中 84 株内生真菌对枸杞胶孢炭疽菌均具有明显的抑制作用,菌株 NQ3GF<sub>1</sub> 与胶孢炭疽菌之间的抑菌带宽度达到了 8.12 mm,分析表明,菌株 NQ3GF<sub>1</sub> 产生的  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶和几丁质酶等次生代谢产物对胶孢炭疽菌的抑制作用较强,但有关枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌的拮抗作用机理和生防潜力鲜有报道。本试验在已有研究的基础上,通过皿内对峙方法探讨枸杞内生真菌培养滤液、挥发物质对胶孢炭疽菌的孢子和菌丝的抑制作用,并对离体枸杞的生防作用做出评价,为枸杞炭疽病的生物防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌种

病原菌:枸杞胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*,由宁夏大学农学院植物病理实验室分离保存。

供试枸杞内生菌及药剂:本实验室于 2017 年 10 月从健康枸杞根内分离获得 279 株枸杞内生真菌,从中初筛出 4 株对胶孢炭疽菌有抑制作用的内生真菌,分别为镰刀菌属 *Fusarium* 菌株 NQ8GII4、NQ8GII7 和 NQ7GII4,篮状菌属 *Talaromyces* 菌株 NQ6GIII11,并于 4℃ 保存于 PDA 培养基上。生物

农药为 3 亿 cfu/g 哈茨木霉菌可湿性粉剂(美国拜沃股份有限公司),对照化学药剂 430 g/L 戊唑醇悬浮剂(山东百农思达生物科技有限公司生产)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 对峙试验

采用两点对峙法在 PDA 平板上筛选对胶孢炭疽菌有拮抗作用的内生真菌。在 PDA 平板上相距 4.5 cm 处分别放置直径为 6 mm 的生长旺盛的胶孢炭疽菌和内生真菌菌饼。设置同时接菌或接种内生真菌 3 d 后再接胶孢炭疽菌两个处理,每处理 3 次重复,以只接胶孢炭疽菌为空白对照。待对照组基本长满皿后,测量对照菌落半径( $R_c$ )和病原菌菌落朝内生真菌方向扩展的半径( $R_p$ ),计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = [(R_c - R_p) / (R_c - 3)] \times 100\%$$

#### 1.2.2 拮抗作用的显微观察

无菌条件下,在距培养皿中心的两端相距 2.25 cm 处分别接种拮抗内生真菌和胶孢炭疽菌的菌饼,中间放置盖玻片(盖玻片上有一层薄薄的琼脂)后于 25℃ 下培养 3 d,并以只接胶孢炭疽菌为对照。待两菌相互接触后,在光学显微镜下观察(400 倍)和拍照(Olympus Optical Co., Ltd., Japan)。

#### 1.2.3 内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌的抑制作用

拮抗内生真菌培养滤液的制备:用 6 mm 打孔器分别打取培养 5 d 的 4 株枸杞内生真菌菌饼,放入装有 100 mL PDB 培养液的三角瓶中,每瓶放入 3 个菌饼,25℃ 150 r/min 培养 7 d 后用无菌滤纸除去菌丝和孢子,0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤除菌,将过滤液放于 4℃ 保存备用。

内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制作用:将融化的 PDA 与不同浓度的培养滤液分别混合,配成培养滤液含量为 5%、10%、15%、20%、25% 的 PDA 平板,每个平板中央放置 1 个胶孢炭疽菌菌饼,以不含内生真菌培养滤液的处理为对照,每组处理重复 3 次,置于 25℃ 霉菌培养箱中培养,待对照长满皿后测量胶孢炭疽菌的直径,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = [(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径}] \times 100\%$$

拮抗内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌孢子萌发的抑制作用:培养滤液的制备同上。孢子悬浮液的制备步骤:将病原菌接种到 PDA 培养基上,放于 25℃ 霉菌培养箱中活化,待菌落表面长出大量突起

的分生孢子器及黑色分生孢子盘后,用接种针挑取黄色分生孢子并将其加入无菌水中,配制成浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液备用。拮抗菌株培养滤液按浓度 100%、80%、60%、40% 和 20% 稀释,将浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 胶孢炭疽菌孢子悬浮液同不同浓度的拮抗菌培养滤液按 1:1(V:V) 混合,使拮抗菌培养滤液终浓度分别为 50%、40%、30%、20% 和 10%,每组处理重复 3 次,以无菌水处理为对照,25℃ 黑暗培养 6 h 后,吸取混合液 200  $\mu$ L 于血球计数器上,在光学显微镜(400 倍)下观察,随机选取 20 个方格,统计孢子数和萌发数(当孢子萌发产生的芽管长度达到孢子宽度一半时即可认为分生孢子已萌发),计算抑制率。

抑制率 = [(对照分生孢子萌发率 - 处理分生孢子萌发率) / 对照分生孢子萌发率]  $\times$  100%。

#### 1.2.4 内生菌产生的挥发性物质对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制作用

将培养 0、2、4、6、8 d 的内生真菌平板分别与接种胶孢炭疽菌的 PDA 平板对扣,使接有内生真菌菌饼的培养皿在下,接有病原菌菌饼的培养皿在上,用封口膜密封。以琼脂块代替内生真菌菌饼为对照,每个处理 3 次重复,25℃ 黑暗条件下培养,待对照病原菌近乎长满皿后,测量各处理的病原菌菌落直径,计算抑制率。

抑制率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径]  $\times$  100%。

#### 1.2.5 拮抗内生真菌对枸杞炭疽病的生防试验

以离体枸杞果和叶为材料,将 10% 的内生真菌培养滤液、10% 的 3 亿 cfu/g 哈茨木霉菌可湿性粉剂和 10% 430 g/L 戊唑醇悬浮剂分别喷雾接种于枸杞果面和叶面,25℃、70% 湿度保湿培养 24 h,于当天、第 3

天和第 5 天用  $1 \times 10^6$  个/mL 胶孢炭疽菌孢子悬浮液进行喷雾接种,以喷施无菌水的处理为对照,待接种内生真菌后第 7 天和第 8 天分别观察枸杞果和叶,按严重程度分级标准统计发病情况,计算病情指数。

严重程度分级为 5 级。0 级:无病斑; I 级:  $0 <$  病斑面积占果(叶)总面积  $\leq 25\%$ ; II 级:  $25\% <$  病斑面积占果(叶)总面积  $\leq 50\%$ ; III 级:  $50\% <$  病斑面积占果(叶)总面积  $\leq 75\%$ ; IV 级:病斑面积占果(叶)总面积  $> 75\%$ 。

病情指数 =  $\sum$  [(各级病株数  $\times$  相应级数值) / (调查总株数  $\times$  最高级数值)]  $\times$  100;

抑制率 = [(空白对照病情指数 - 处理组病情指数) / 空白对照病情指数]  $\times$  100%。

#### 1.2.6 数据处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌对胶孢炭疽菌的拮抗作用

对峙试验结果(表 1)表明,4 株内生真菌对胶孢炭疽菌的生长均有明显抑制作用。不同内生真菌菌株对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制率有一定差异,先接内生真菌 3 d 后再接胶孢炭疽菌的抑制作用普遍较高,其中抑制率最高的为菌株 NQ8GII4,抑制率达到 93.43%;其次为菌株 NQ7GII4,抑制率为 81.42%;内生真菌和胶孢炭疽菌同时接对胶孢炭疽菌的抑制率普遍较低,抑制率小于 66%。由图 1 可以看出,4 株拮抗内生真菌与胶孢炭疽菌之间产生明显的抑菌带,提前 3 d 接种内生真菌对胶孢炭疽菌的抑制作用更强,在抑菌带的边缘,病原菌的菌丝体分布不均、明显变厚(图 1 f)、颜色变成黄褐色(图 1 h),菌丝的生长受到明显的抑制。

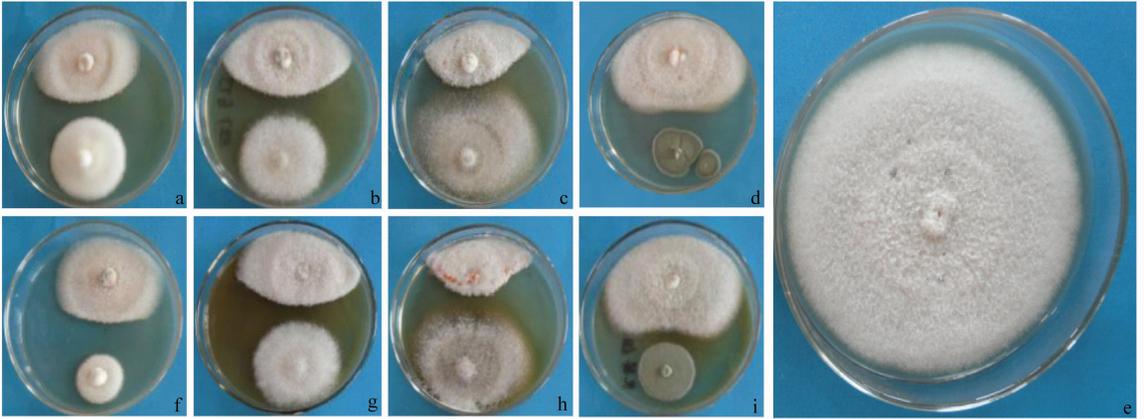
表 1 枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制作用<sup>1)</sup>

Table 1 Inhibitory effects of endophytic fungi from *Lycium barbarum* on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*

菌株 Isolate	抑制率/% Inhibition rate	
	同时接种 Simultaneous inoculation	接种内生真菌 3 d 后再接胶孢炭疽菌 Inoculated with endophytic fungi 3 days earlier than <i>C. gloeosporioides</i>
NQ8GII4	(65.77 $\pm$ 1.12)a	(93.43 $\pm$ 1.62)a
NQ8GII7	(57.83 $\pm$ 3.69)b	(73.88 $\pm$ 2.13)c
NQ7GII4	(64.50 $\pm$ 1.02)a	(81.42 $\pm$ 1.98)b
NQ6GIII11	(45.75 $\pm$ 2.13)c	(42.17 $\pm$ 1.99)d

1) 表中数据为平均值  $\pm$  标准误,同列数据后不同字母表示经邓肯氏新复极差法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。下同。

Data in the table are mean  $\pm$  SE. Data in the same column followed by different lowercase letters are significantly different by Duncan's new multiple range test at  $P < 0.05$  level. The same blow.



a, f: NQ8GII4; b, g: NQ8GII7; c, h: NQ7GII4; d, i: NQ6GIII1; e: 对照; a-d: 同时接种内生真菌与胶孢炭疽菌; f-i: 接种内生真菌3 d后再接胶孢炭疽菌(注a、b、c、d、f、g、h和i中, 培养皿中上侧为胶孢炭疽菌, 下侧为内生真菌)  
a, f: NQ8GII4; b, g: NQ8GII7; c, h: NQ7GII4; d, i: NQ6GIII1; e: CK; a-d: Simultaneous inoculation of endophytic fungus and *C. gloeosporioides*; f-i: Inoculated with the endophytic fungus 3 days earlier than *C. gloeosporioides* (a, b, c, d, f, g, h and i: The upper part of the culture dish is *C. gloeosporioides*, and the lower part is endophytic fungus)

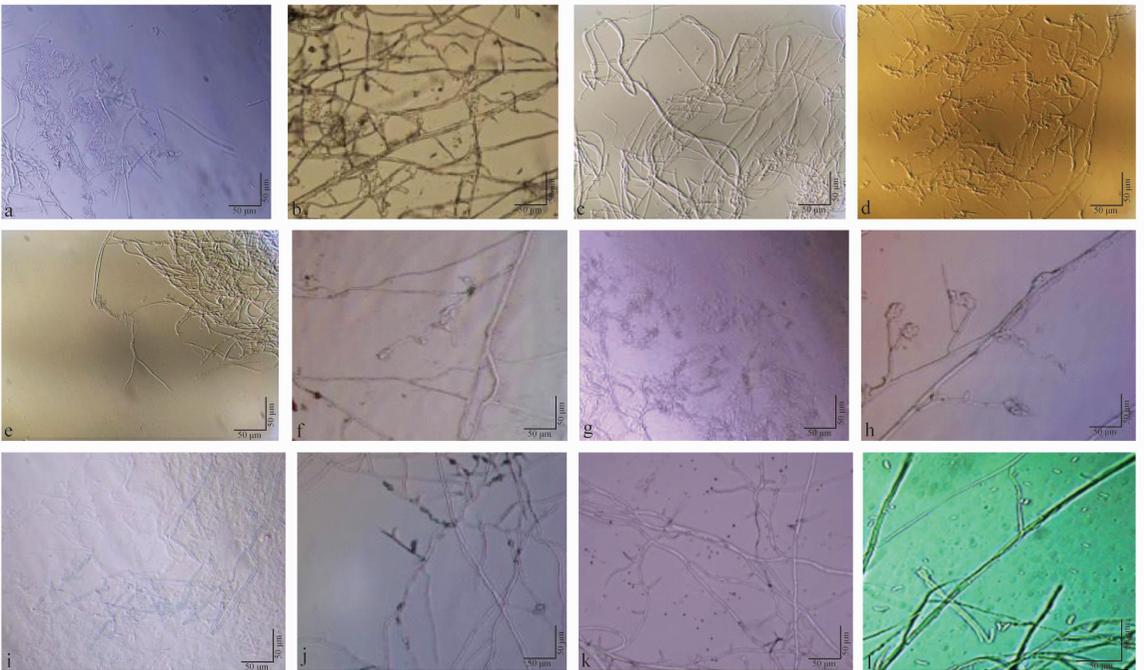
图1 枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory action of endophytic fungi against *Colletotrichum gloeosporioides*

2.2 拮抗作用的显微观察

显微观察发现, 在 PDA 培养基上正常生长的胶孢炭疽菌菌丝细长, 粗细均匀, 表面光滑, 无肿胀、膨大、崩解等现象, 偶见不正常状态的菌丝; 炭疽菌孢子大小均匀, 无干瘪现象。受拮抗菌抑制的胶孢炭疽菌菌丝出现了畸变现象, 主要表现为菌丝体扭曲

变形及断裂(图 2 a、d、g、j 和 e), 膨大肿胀及内容物流出(图 2 b、e、h、i 和 k)等, 还可见拮抗菌缠绕病原菌(图 2 c、f 和 l)等现象, 说明生防菌可能产生了某些溶菌物质消解了病原菌菌丝体, 致使其营养物质流出, 从而产生畸变。



a-c: 菌株NQ8GII4; d-f: 菌株NQ8GII7; g-i: 菌株NQ7GII4; j-l: 菌株NQ6GIII1  
a-c: Strain NQ8GII4; d-f: Strain NQ8GII7; g-i: Strain NQ7GII4; j-l: Strain NQ6GIII1

图2 枸杞内生真菌与胶孢炭疽菌互作显微观察

Fig. 2 Microscopic observation of the interaction between endophytic fungi and *Colletotrichum gloeosporioides*

## 2.3 内生真菌对胶孢炭疽菌的抑制作用

### 2.3.1 内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制作用

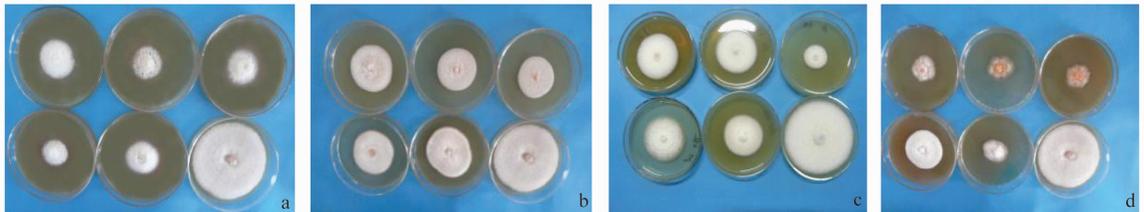
4 株拮抗内生真菌的 PDB 培养滤液对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制效果不同。在不同培养滤液浓度

下,菌株 NQ7GII4 和 NQ8GII4 抑制率普遍较高,在菌株 NQ7GII4 培养滤液含量为 15% 时,对胶孢炭疽菌的抑制率高达 70.75%,其次菌株 NQ8GII4 的培养滤液含量为 10% 时抑制率为 65.24% (表 2)。

表 2 枸杞内生真菌不同浓度培养滤液对胶孢炭疽菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory on *Colletotrichum gloeosporioides* by different concentrations of culture filtrate of endophyte

菌株 Isolate	抑制率/% Inhibition rate				
	5%	10%	15%	20%	25%
NQ8GII4	(57.94±0.63)b	(65.24±1.57)a	(62.77±2.09)a	(54.36±0.44)a	(65.46±0.67)a
NQ8GII7	(53.59±0.79)c	(53.17±2.14)b	(45.12±0.95)b	(39.77±0.77)c	(37.97±1.26)c
NQ7GII4	(65.59±1.82)a	(68.63±1.79)a	(70.75±1.24)a	(50.55±0.55)b	(63.97±1.25)a
NQ6GIII11	(45.55±0.83)d	(51.72±2.69)b	(63.31±4.70)a	(46.87±3.92)b	(50.39±3.77)b



a-d: 菌株NQ8GII4, NQ8GII7, NQ7GII4, NQ6GIII11  
a-d: Strain NQ8GII4, NQ8GII7, NQ7GII4, NQ6GIII11

图 3 枸杞内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌菌丝的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of endophytic fungal culture filtrate on mycelia of *Colletotrichum gloeosporioides*

### 2.3.2 内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌孢子萌发的抑制作用

4 株内生真菌菌株培养滤液对胶孢炭疽菌分生孢子萌发均有抑制作用,且不同菌株的培养滤液对分生孢子萌发的抑制作用有很大差异(表 3)。其中菌株 NQ8GII4 培养滤液在不同浓度下对胶孢炭疽菌分生孢子的抑制作用普遍较高,培养滤液浓度在

30% 以上时,对病菌孢子萌发抑制率均达到 80% 以上,其中浓度为 50% 时,抑制率高达 96.73%;其次菌株 NQ8GII7 的培养滤液在 30% 以上浓度时,对病菌孢子萌发抑制率均达到 75% 以上,在浓度为 50% 时,抑制率为 88.38%。说明菌株 NQ8GII4 和 NQ8GII7 的培养滤液中含有较高的抑菌成分,具有很好的抑菌活性。

表 3 枸杞内生真菌不同浓度培养滤液对胶孢炭疽菌孢子萌发的抑制作用

Table 3 Inhibition on spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides* by different concentrations of culture filtrate of endophytic fungi

菌株 Isolate	萌发率/% Germination rate					抑制率/% Inhibition rate				
	10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%
NQ8GII4	(4.41±0.18)ab	(4.17±0.24)a	(1.86±0.17)b	(1.76±0.17)c	(0.34±0.17)c	(57.37±3.86)a	(58.84±3.59)ab	(86.36±1.25)a	(83.68±1.35)a	(96.73±2.33)a
NQ8GII7	(4.86±0.34)ab	(4.67±0.47)a	(3.45±0.45)ab	(2.69±0.30)b	(1.27±0.17)b	(41.33±8.34)ab	(53.97±5.17)ab	(75.12±3.09)b	(75.17±4.94)a	(88.38±2.97)b
NQ7GII4	(5.47±0.59)a	(5±0.71)a	(2.76±0.36)ab	(4.20±0.18)a	(1.98±0.17)a	(41.12±5.49)ab	(50.96±5.31)b	(78.71±4.18)ab	(58.76±4.58)b	(81.77±3.27)b
NQ6GIII11	(3.92±0.35)b	(3.67±0.47)a	(3.09±0.18)a	(4.24±0.38)a	(1.26±0.21)b	(31.69±5.51)b	(64.02±3.45)a	(75.84±1.13)b	(60.6±3.96)b	(88.37±2.97)b

## 2.4 内生真菌挥发性物质对胶孢炭疽菌菌丝的影响

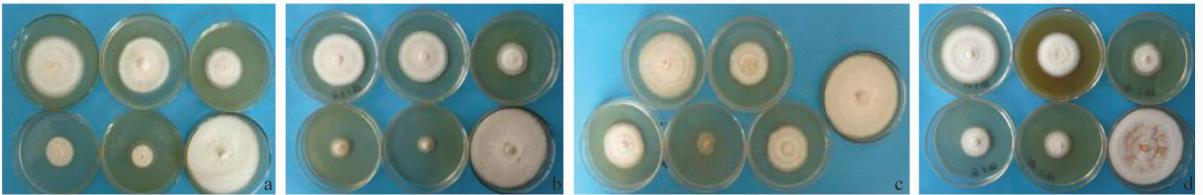
由表 4 可知,内生真菌产生的挥发性物质对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制率随着内生真菌接种天数的增加而增大。其中最大抑制率为接种 NQ8II7 后第 6 天再接种胶孢炭疽菌,抑制率为 83.44%,NQ7GII4 和

菌株 NQ6GIII11 的抑制率也在 70% 以上。说明枸杞内生真菌产生的挥发性物质对胶孢炭疽病菌菌丝生长影响显著(图 4),其中接种菌株 NQ8GII7 和 NQ7GII4 6 d 后,胶孢炭疽菌菌丝生长势减弱、菌丝变薄(图 4b 和 c)。

表 4 枸杞内生真菌挥发性物质对胶孢炭疽病菌菌丝生长的抑制率

Table 4 Inhibition rates of volatiles produced by endophytic fungi against mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*

菌株 Isolate	抑制率/% Inhibition rate				
	8 d	6 d	4 d	2 d	0 d
NQ8GII4	(71.14±1.03)d	(54.51±0.39)c	(60.90±1.54)c	(53.45±1.07)b	(41.91±2.77)a
NQ8GII7	(79.09±0.39)a	(83.44±3.32)a	(61.24±1.35)b	(62.43±0.75)b	(53.79±1.31)c
NQ7GII4	(52.12±1.07)b	(77.13±1.19)a	(44.15±4.78)b	(54.05±1.75)b	(51.30±0.44)b
NQ6GIII11	(78.32±0.73)a	(71.68±1.00)b	(65.16±2.05)c	(55.56±1.32)d	(37.90±1.39)e



a: 优先接种菌株NQ8GII4 8、6、4、2、0 d和对照; b: 优先接种菌株NQ8GII7 8、6、4、2、0 d和对照; c: 优先接种菌株NQ7GII4 8、6、4、2、0 d和对照; d: 优先接种菌株NQ6GIII11 8、6、4、2、0 d和对照  
a: Strain NQ8GII4 is pre-inoculated for 8, 6, 4, 2 and 0 days and CK; b: Strain NQ8GII7 is pre-inoculated for 8, 6, 4, 2 and 0 days and CK; c: Strain NQ7GII4 is pre-inoculated for 8, 6, 4, 2 and 0 days and CK; d: Strain NQ6GIII11 is pre-inoculated for 8, 6, 4, 2 and 0 days and CK

图 4 枸杞内生真菌挥发性物质对胶孢炭疽菌菌丝生长的抑制作用

Fig. 4 Inhibition activity of the volatiles produced by endophytic fungi against mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*

## 2.5 内生真菌培养滤液对胶孢炭疽菌的离体生防效果

内生真菌培养滤液对枸杞离体果和叶生防作用结果表明(表 5 和表 6),预先接种 10% 内生真菌培养滤液,第 3 天接种病原菌的生防效果优于第 5 天接种病原菌的生防效果,且第 3 天接种炭疽菌孢子悬浮液,枸杞炭疽病的发病率及病情指数显著降

低,其中菌株 NQ8GII4 培养滤液的生防效果最好,抑制率分别为 92.54% 和 95.57%,其抑制率与化学农药 10% 430 g/L 戊唑醇悬浮剂(94.41% 和 96.19%)的防治效果相当,其次为菌株 NQ8GII7,抑制率为 88.17% 和 94.33%,优于生物农药 10% 的 3 亿 cfu/g 哈茨木霉菌可湿性粉剂(64.64% 和 93.03%)的抑制率。

表 5 枸杞内生真菌对枸杞果炭疽病的生防效果

Table 5 Biocontrol effects of endophytic fungi of *Lycium barbarum* on anthrax in the fruits of *Lycium barbarum*

处理 Treatment	同时接种 Simultaneous inoculation		第 3 天接胶孢炭疽菌 Inoculation of <i>C. gloeosporioides</i> on the third day		第 5 天接胶孢炭疽菌 Inoculation of <i>C. gloeosporioides</i> on the fifth day	
	病情指数 Disease index	抑制率/% Inhibition rate	病情指数 Disease index	抑制率/% Inhibition rate	病情指数 Disease index	抑制率/% Inhibition rate
CK	(100.00±0.00)a	—	(97.78±3.97)a	—	(16.12±1.14)a	—
NQ8GII4	(31.60±0.26)b	(84.95±1.58)a	(12.07±1.99)c	(92.54±2.53)a	(8.80±0.00)cd	(49.99±3.66)ab
NQ8GII7	(13.89±0.00)d	(85.99±1.90)a	(13.69±1.00)c	(88.17±2.06)a	(12.98±1.00)b	(25.57±5.58)c
NQ7GII4	(18.60±0.93)cd	(87.96±2.15)a	(21.24±2.10)c	(77.67±1.41)a	(10.93±1.02)bc	(38.16±2.61)bc
NQ6GIII11	(16.88±0.74)cd	(82.87±1.67)a	(17.64±1.95)c	(83.41±4.13)a	(10.79±0.84)bc	(37.00±2.26)bc
3 亿 cfu/g 哈茨木霉 WP <i>Trichoderma harzianum</i> 3 × 10 <sup>8</sup> cfu/g WP	(20.83±4.37)c	(77.66±5.12)a	(37.15±6.60)b	(64.61±7.86)b	(11.84±1.70)bc	(29.75±11.03)bc
430 g/L 戊唑醇 SC tebuconazole 430 g/L SC	(14.95±1.74)cd	(84.03±1.47)a	(11.98±1.88)c	(94.41±1.37)a	(6.85±1.00)d	(63.30±5.30)a



a, h, o: 对照; b, i, p: 菌株NQ8GII4培养滤液; c, j, q: 菌株NQ8GII7培养滤液; d, k, r: 菌株NQ7GII4培养滤液; e, l, s: 菌株NQ6GIII11培养滤液; f, m, t: 10% 3亿cfu/g哈茨木霉WP; g, n, u: 10% 430 g/L戊唑醇SC。下同

a, h, o: CK; b, i, p: Culture filtrate of strain NQ8GII4; c, j, q: Culture filtrate of strain NQ8GII7; d, k, r: Culture filtrate of strain NQ7GII4; e, l, s: Culture filtrate of strain NQ6GIII11; f, m, t: *Trichoderma harzianum* 3×10<sup>8</sup> cfu/g WP; g, n, u: tebuconazole 430 g/L SC. The same below

图 5 枸杞内生真菌对枸杞果胶孢炭疽菌的生防效果

Fig. 5 Biocontrol effects of endophytic fungi of *Lycium barbarum* on *Colletotrichum gloeosporioides* of *Lycium barbarum* fruits

表 6 枸杞内生真菌对枸杞叶胶孢炭疽菌的生防效果

Table 6 Biocontrol effects of endophytic fungi of *Lycium barbarum* on *Colletotrichum gloeosporioides* of *Lycium barbarum* leaves

处理 Treatment	同时接种 Simultaneous inoculation		第 3 天接胶孢炭疽菌 Inoculation of <i>C. gloeosporioides</i> on the third day		第 5 天接胶孢炭疽菌 Inoculation of <i>C. gloeosporioides</i> on the fifth day	
	病情指数 Disease index	抑制率/% Inhibition rate	病情指数 Disease index	抑制率/% Inhibition rate	病情指数 Disease index	抑制率/% Inhibition rate
	CK	(100.00±0.00)a	—	(100.00±0.00)a	—	(51.01±1.10)a
NQ8GII4	(9.26±1.00)c	(91.67±0.00)ab	(6.67±0.97)cd	(95.57±0.97)a	(14.09±0.93)b	(81.74±2.14)a
NQ8GII7	(8.33±0.00)c	(91.67±1.52)ab	(9.32±1.01)bc	(94.33±0.19)ab	(14.09±1.05)b	(81.31±2.24)a
NQ7GII4	(8.33±0.00)c	(90.74±0.95)ab	(11.98±0.23)b	(91.20±0.00)bc	(13.05±0.15)b	(75.10±1.19)a
NQ6GIII11	(11.11±0.00)b	(88.89±0.70)c	(12.11±1.99)b	(88.54±0.20)c	(12.90±1.92)b	(81.67±4.84)a
3 亿 cfu/g 哈茨木霉 WP <i>Trichoderma harzianum</i> 3× 10 <sup>8</sup> cfu/g WP	(9.26±0.94)c	(90.74±2.34)ab	(13.17±1.00)b	(93.03±2.47)ab	(14.54±1.61)b	(75.94±3.79)a
430 g/L 戊唑醇 SC tebuconazole 430 g/L SC	(6.48±0.99)d	(93.52±0.61)a	(4.79±1.01)d	(96.19±1.81)a	(14.43±0.63)b	(79.11±2.22)a

### 3 结论与讨论

本试验分离的 4 株拮抗菌菌株经形态学及分子生物学鉴定, NQ8GII4 菌株属于 *F. nematophilum*、NQ8GII7 和 NQ7GII4 均为腐皮镰刀菌 *F. solani*、NQ6GIII11 为变形篮状菌 *T. variabilis*。从前期灌根

试验可看出所分离的高拮抗枸杞内生真菌能显著促进枸杞生长, 净生长量能达到对照的 1.7 倍, 根条数为对照的 2.3 倍, 为非致病菌<sup>[9]</sup>。其中分离的菌株 NQ8GII4 为 *F. nematophilum*, 对胶孢炭疽菌有较好的抑制作用。孙文斌等<sup>[10]</sup>从地枫皮根中分离得到一株内生真菌 *F. nematophilum* 菌株, 其对茶轮斑病菌

*Pestalotiopsis theae*、甘蓝黑斑病菌 *Alternaria oleracea*、甘蔗凤梨病菌 *Ceratocystis paradoxa* 和玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum* 等 8 种植物病原菌有广谱抑菌活性。郑燕等<sup>[11]</sup>也从凤丹根部分离出一株内

生真菌 *F. nematophilum* 菌株,其对链格孢 *Alternaria alternata*、毛霉 *Mucor* sp. 和青霉 *Penicillium* sp. 等 6 种病原菌的抑制率都在 80% 以上,说明 *F. nematophilum* 是较好的杀菌剂出发菌种<sup>[11]</sup>。

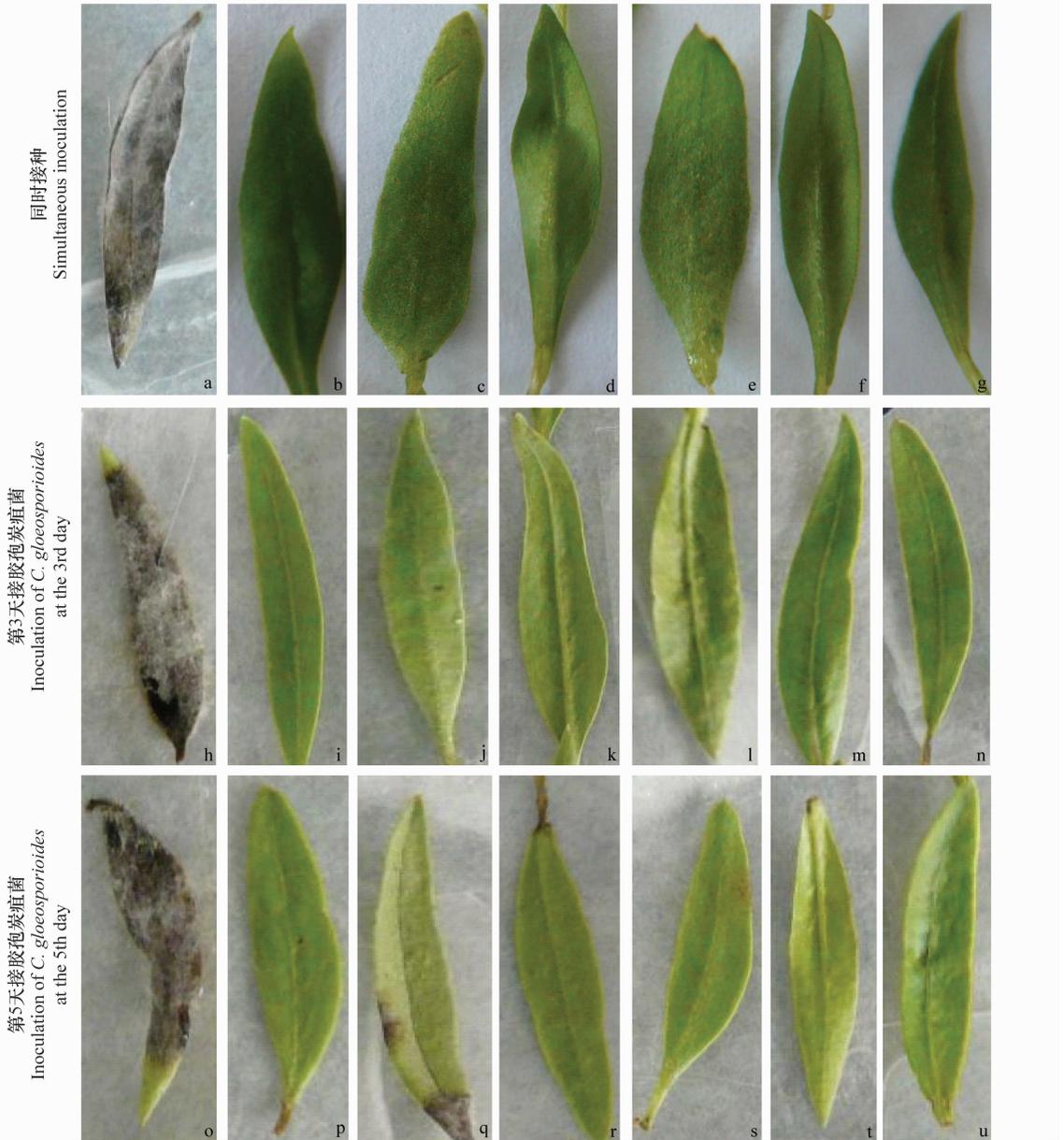


图 6 枸杞内生真菌对枸杞叶胶孢炭疽菌的生防效果

Fig. 6 Biocontrol effects of endophytic fungi of *Lycium barbarum* on *Colletotrichum gloeosporioides* of *Lycium barbarum* leaves

试验通过皿内对峙培养,4 株枸杞内生真菌与胶孢炭疽菌之间有明显的抑菌带,并且靠近拮抗菌边缘的病原菌菌丝变暗,说明拮抗菌产生的某种物质发挥了抑制作用。枸杞内生真菌培养滤液能显著抑制病原菌菌丝生长和孢子萌发,且内生真菌产生的挥发性物质对病原菌菌丝具有明显的抑制效果,能使病原菌菌丝变薄,生长势减弱,表明枸杞内生真菌分泌了能抑制病原菌菌丝生长的活性物质。郑敏

等<sup>[12]</sup>筛选出的两株菌株 TB09 和 TB72,其挥发性代谢产物能有效抑制胶孢炭疽菌的生长,其中百里香酚是最主要的抑菌活性成分。本试验内生真菌产生的挥发性物质对胶孢炭疽菌影响显著,但关于挥发性物质的性质、种类和结构仍不明确,需要进一步研究。

长期以来,枸杞炭疽病的防治主要依靠化学农药,但由于化学农药严重污染农产品和环境,危及人畜健康,因此筛选和利用有益微生物来防治植物病

害是解决问题的有效途径<sup>[13]</sup>。由于植物内生真菌不受外界环境的影响,能够稳定发挥其生防效果,是目前研究的热点<sup>[14]</sup>。本试验发现同时接菌和第 3 天接种胶孢炭疽菌的防效均优于第 5 天接种,说明菌株 NQ8GII4 尚未侵扰宿主之前就已经发挥保护作用,且内生真菌主要在植物表面起杀菌作用。本实验室分离的 NQ8GII4 菌株的发酵液内生真菌的持效期在 5 d 左右,且提前接种内生真菌的防效较好,因为预先接种内生真菌后,其能迅速占据植物根系的营养和空间,发挥生防作用<sup>[15]</sup>。曹荣花等<sup>[16]</sup>的研究也认为,芦苇内生真菌 *Choiromyces aboriginum* Mülwlc6 侵染 48 h 即可在植物体内定殖,在温室防治黄瓜猝倒病的过程中,防治效果高达 88.49%,接种病原菌 6 d 后发病情况基本稳定,显示出 *C. aboriginum* Mülwlc6 具有较好的生防潜力和应用前景。本试验中枸杞接种胶孢炭疽菌 3 d 时生防效果最好,5 d 后发病情况基本稳定,对离体果和叶防效高达 92.54% 和 95.57%,具有很好的生防效果,但还需在大田进一步进行验证。此外,4 株枸杞内生真菌培养滤液的浓度与防治效果也有密切的关系,本试验前期共设置了 10%、20%、40%、80% 和 100% 5 个浓度梯度的内生真菌培养滤液,研究发现,当浓度过大时,内生真菌与宿主植物处于敌对状态,会使宿主植物产生腐败斑,而选用 10%~40% 浓度范围时具有很好的抑菌作用,且对宿主植物没有任何不良影响,说明内生真菌施用的剂量与其防效有很大关系,但关于内生真菌具体的侵染和有效防治胶孢炭疽菌的机制还有待深入研究。

## 参考文献

- [1] 曲玲, 焦恩宁, 张宗山. 枸杞炭疽病研究进展[J]. 北方园艺, 2011(20): 195-199.
- [2] 胡美玲. 我国枸杞对外出口面临的问题与发展策略[J]. 对外经

贸实务, 2018(10): 49-53.

- [3] 陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34.
- [4] ALY A H, EDRADAEBEL R, INDRIANI I, et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense* [J]. Journal of Natural Products, 2008, 71(6): 972-980.
- [5] MALINOWSKI D P, BELESKY D P. *Neotyphodium coenophialum*-endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus [J]. Journal of Plant Nutrition, 1999, 22(4/5): 835-853.
- [6] 陈丽媛, 孙翠焕. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 98-101.
- [7] 杨松, 李春杰, 黄玺, 等. 被内生真菌侵染的禾草提取液对真菌的抑制作用[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 234-240.
- [8] LEHTONEN P T, HELANDER M, SIDDIQUI S A. et al. Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*) [J]. Biology Letters, 2006, 2(4): 620-623.
- [9] 徐全智. 宁夏枸杞内生真菌多样性及其生防作用评价[D]. 银川: 宁夏大学, 2017.
- [10] 孙文斌, 黄小京, 冯蓓蓓, 等. 地枫皮内生真菌 DFP-G-7 的分离鉴定、生物学特性及抑菌活性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 97-100.
- [11] 郑艳, 戴婧婧, 管玉鑫, 等. 凤丹内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 45-50.
- [12] 郑敏. 芒果炭疽病挥发性抑菌物质产生菌的筛选及拮抗机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [13] 康传志, 郭兰萍, 周涛, 等. 中药材农残研究现状的探讨[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 155-159.
- [14] 胡婵娟, 刘国华, 吴雅琼. 土壤微生物生物量及多样性测定方法评述[J]. 生态环境学报, 2011, 20(S1): 1161-1167.
- [15] 王浩, 方燕, 刘润进, 等. 丛枝菌根中养分转运、代谢、利用与调控研究的最新进展[J]. 植物生理学报, 2018(11): 1645-1658.
- [16] 曹荣花, 刘晓光, 高克祥, 等. 芦苇内生真菌 *Choiromyces aboriginum* Mülwlc6 的拮抗作用及其生物防治潜力[J]. 植物保护学报, 2008, 35(2): 107-112.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 124 页)

- [32] DESPRÉS C, CHUBAK C, ROCHON A, et al. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1 [J]. Plant Cell, 2003, 15: 2181-2191.
- [33] KESARWANI M, YOO J, DONG Xinnian. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 336-346.
- [34] ROCHON A, BOYLE P, WIGNES T, et al. The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines [J]. Plant

Cell, 2006, 18: 3670-3685.

- [35] TADA Y, SPOEL S H, PAJEROWSKA-MUKHTAR K, et al. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins [J]. Science, 2008, 321: 952-956.
- [36] JOHNSON C, MHATRE A, ARIAS J. NPR1 preferentially binds to the DNA inactive form of *Arabidopsis* TGA2 [J]. Biochimica Biophys Acta, 2008, 1779: 583-589.
- [37] DIXON R A, ACHNINE L, KOTA P, et al. The phenylpropanoid pathway and plant defense: A genomics perspective [J]. Molecular Plant Pathology, 2002, 3: 371-390.

(责任编辑: 田 喆)